

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION  
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle  
Bureau international



(43) Date de la publication internationale  
31 mars 2005 (31.03.2005)

PCT

(10) Numéro de publication internationale  
WO 2005/028641 A1

(51) Classification internationale des brevets<sup>7</sup> : C12N 5/06

(21) Numéro de la demande internationale :  
PCT/FR2004/050406

(22) Date de dépôt international :  
1 septembre 2004 (01.09.2004)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :  
0310382 2 septembre 2003 (02.09.2003) FR

(71) Déposant et

(72) Inventeur : PRIVAT, Alain [FR/FR]; 300, rue des Graves,  
F-34980 ST CLEMENT DE RIVIERE (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : MAR-  
CHAL, Sophie [FR/FR]; 1, rue des Gavians, F-34750  
VILLENEUVE LES MAGUELONE (FR). HUGNOT,  
Jean-Philippe [FR/FR]; 9, rue des Sycomores, F-34080  
MONTPELLIER (FR).

(74) Mandataire : RHEIN, Alain; 2460, avenue Albert Ein-  
stein, F-34000 MONTPELLIER (FR).

(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de  
protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AT,  
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO,  
CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB,  
GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG,  
KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG,  
MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH,  
PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN,  
TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre  
de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH,  
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,  
ZW), eurasién (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),  
européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,  
FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI,  
SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,  
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

- avec rapport de recherche internationale
- avant l'expiration du délai prévu pour la modification des  
revendications, sera republiée si des modifications sont re-  
çues

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrégia-  
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et  
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de  
la Gazette du PCT.

(54) Title: METHOD FOR PRODUCTION OF NEURONS FROM CELLS OF A CELL LINE

(54) Titre : PROCEDE DE PRODUCTION DE NEURONES A PARTIR DE CELLULES D'UNE LIGNEE CELLULAIRE

(57) Abstract: The invention relates to a method for production of neurons from cells of a cell line which may be differentiated to produce neurons in particular, whereby said cells are cultivated in spheres, preferably by exposing the same to growth factors, such as, for example, EGF (epidermal growth factor) and/or bFGF (basic fibroblast growth factor) or LIF (Leukemia Inhibitory Factor), in a given growth medium, the differentiation in said spheres is induced on forcing the same to adhere to a substrate, after removal of the growth factors EGF and/or bFGF or LIF, and cultivating the same in the growth medium for an appropriate duration. Said method is characterised in that cells of the human embryonic teratocarcinoma NT2 are used.

(57) Abrégé : L'invention a trait à un procédé de production de neurones à partir de cellules d'une lignée cellulaire apte à se différencier pour produire notamment des neurones, dans lequel : - on cultive lesdites cellules en sphères, de préférence en les exposant à des facteurs de croissance, tels que, par exemple, EGF (epidermal growth factor) et/ou bFGF (basic fibroblast growth factor) ou du LIF (Leukemia Inhibitory Factor), dans un milieu de croissance défini, - on induit la différenciation desdites sphères en les faisant adhérer sur un substrat, après élimination des facteurs de croissance EGF et/ou bFGF ou LIF, et en les cultivant dans le milieu de croissance pendant un laps de temps approprié. Ce procédé est caractérisé en ce que l'on utilise les cellules de la lignée de térato-carcinome embryonnaire humain NT2.

WO 2005/028641 A1

Procédé de production de neurones à partir de cellules d'une lignée cellulaire

La présente invention concerne un procédé de production de neurones à partir de cellules d'une lignée cellulaire humaine apte à se différencier pour produire notamment des neurones, dans lequel :

- on cultive lesdites cellules en sphères, en les exposant à des facteurs de croissance, tels que, par exemple, EGF (epidermal growth factor) et/ou bFGF (basic fibroblast growth factor) ou LIF (Leukemia Inhibitory Factor), dans un milieu de croissance défini,
- on induit la différenciation desdites sphères en les faisant adhérer sur un substrat, après élimination des facteurs de croissance EGF et/ou bFGF ou LIF, et en les cultivant dans le milieu de croissance pendant un laps de temps approprié.

L'invention concerne également l'utilisation, pour différentes applications, des neurones issus de la mise en œuvre de ce procédé.

De nombreux laboratoires de recherche travaillent à l'heure actuelle à la mise au point de techniques visant à permettre à la fois la compréhension et la maîtrise des fonctions du système nerveux central et périphérique, surtout à des fins thérapeutiques, mais aussi plus simplement dans le but d'obtenir des modèles utiles pour l'évolution de la recherche.

Ainsi, le développement des procédés de production de neurones s'inscrit notamment dans les projets de mise au point de thérapies cellulaires qui, avec la greffe de cellules souches pluripotentes et/ou progénitrices, représentent une alternative prometteuse permettant d'envisager le remplacement d'éventuelles cellules détruites de la moelle épinière et du cerveau et recréer un environnement propice à la régénération nerveuse.

Maîtriser la production de neurones représente par conséquent un espoir de guérison pour de nombreux malades souffrant de lésions de la moelle épinière, ou de maladies neurodégénératives, dont les conséquences les plus manifestes se caractérisent par des dysfonctionnements de la transmission des signaux nerveux envoyés par le cerveau aux structures

périphériques, pouvant aboutir, dans les cas extrêmes, à des paralysies accompagnées de déficits sensoriels.

Par ailleurs, le fait de pouvoir disposer de neurones humains produits en laboratoire en grande quantité peut également favoriser notablement la conduite d'études menées in vitro sur des molécules d'intérêt thérapeutique, et permet d'envisager un modèle avantageux dans le cadre de la recherche des gènes importants pour le développement du système nerveux central et périphérique.

10 Une des techniques employées actuellement pour produire des neurones repose sur la propriété de pluripotence des cellules souches neurales, lesquelles, tel que décrit par Gage et al. (Current Opinion in Neurobiology 1998, 8 : 671-676), sont amenées après une phase de culture en présence de facteurs de croissance conduisant à des agrégats sphériques, à se différencier en neurones et glie après adhésion sur un support et élimination des facteurs de croissance.

Bien que les cellules souches neurales soient considérées comme avantageuses du fait de leur absence de risques cancérigènes, et qu'elles font aujourd'hui l'objet de nombreux travaux de recherche, cette technique n'offre cependant encore que des perspectives restreintes, car la différenciation de ces cellules après transplantation ne conduit presque exclusivement qu'à la production de cellules gliales, c'est à dire d'astrocytes et d'oligodendrocytes, au détriment de la production de neurones qui ne représentent que 1 à 5% de l'ensemble des cellules obtenues.

Un rendement aussi faible ne permet évidemment pas d'envisager une réimplantation de neurones dans une éventuelle lésion.

En outre, l'on sait que les astrocytes sont susceptibles, après une greffe, de limiter la croissance des neurones et de sécréter des molécules modifiant de façon péjorative l'environnement des cellules greffées.

35 D'autres procédés connus consistent encore à obtenir des neurones après différenciation des cellules de la lignée de

tératocarcinome embryonnaire humain (NT2) en les traitant à l'acide rétinoïque.

L'une d'entre elles, décrite notamment par Andrews et al. (Developmental Biology 1984, 103 :285-293), consistant à cultiver la lignée cellulaire NT2 en monocouche, conduit ainsi à la production de 5% de neurones matures post-mitotiques, dont une succession de réensemencements dans des conditions spécifiques permet au final la purification à 99% de neurones NT2-N.

Cette technique de production de neurones est cependant longue, fastidieuse et présente l'inconvénient d'une perte importante de matériel au cours des différents réensemencements.

En outre, le traitement à l'acide rétinoïque suppose l'utilisation de sérum bovin, comportant pour certaines applications un risque potentiel d'encéphalite spongiforme bovine, ou d'hépatite.

Une autre méthode connue, décrite par Cheung et Al (BioTechniques 1999, 26 :946-954), basée sur la formation préalable d'agrégats cellulaires à partir des cellules NT2, bien que présentant l'avantage de réduire le temps requis par la technique de culture en monocouches pour induire la différenciation neuronale, suppose également l'emploi de sérum bovin, et par conséquent, l'éventualité des risques précédemment décrits.

C'est en recherchant des solutions aptes à pallier ces divers inconvénients que les inventeurs du présent procédé ont constaté que les cellules de la lignée de tératocarcinome embryonnaire humain, traitées sur la base de la méthode utilisée pour la différenciation des cellules souches neurales, mais dans des conditions très spécifiques et scrupuleusement mises au point, étaient aptes, de manière tout à fait inattendue et étonnante, à produire un pourcentage particulièrement important de neurones, sans perte de matériel, et en toute sécurité, car la solution envisagée ne suppose plus l'emploi de sérum bovin.

En conséquence, la présente invention constitue maintenant une solution concrète pour les différentes applications exposées

précédemment, et permet donc d'envisager sérieusement leur développement.

En fait, l'invention vise en général un procédé de production de neurones à partir de cellules d'une lignée cellulaire apte à se différencier pour produire notamment des neurones, dans lequel :

- on cultive lesdites cellules en sphères, de préférence en les exposant à des facteurs de croissance, tels que, par exemple, EGF (epidermal growth factor) et/ou bFGF (basic fibroblast growth factor) ou LIF (Leukemia Inhibitory Factor), dans un milieu de croissance défini,
- on induit la différenciation desdites sphères en les faisant adhérer sur un substrat, après élimination des facteurs de croissance EGF et/ou bFGF ou LIFs, et en les cultivant dans le milieu de croissance pendant un laps de temps approprié,

caractérisé en ce que l'on utilise les cellules de la lignée de tératocarcinome embryonnaire humain NT2.

Selon un mode de mise en œuvre préférentiel, le présent procédé comprend essentiellement trois phases : une première étape d'induction, une étape d'expansion, à la fois en volume et en nombre, des sphères issues de l'induction, et enfin une étape de différenciation en neurones.

Pour l'étape d'induction des cellules de la lignée de tératocarcinome embryonnaire humain (NT2) en sphères:

- on dissocie des cellules de la lignée de tératocarcinome embryonnaire humain (NT2) cultivées en monocouches avec une solution de trypsine/EDTA,
- on enseme les cellules NT2, une fois dissociées, de préférence à 100 000 cellules/ml dans des flacons, par exemple de type FALCON (marque déposée) de 75 ml à bouchon filtrant contenant le milieu de croissance auquel est rajouté extemporanément le facteur de croissance EGF et/ou le facteur de croissance bFGF,

- on les laisse proliférer pendant une période d'au moins sept jours.

Selon une autre caractéristique avantageuse du procédé considéré, on utilise un milieu de croissance défini dépourvu de  
5 sérum bovin.

Pour réaliser l'étape d'expansion, on renouvelle régulièrement une fraction du milieu de croissance au cours de la période de culture des cellules NT2 en sphères.

Ceci est de préférence réalisé par le fait que l'on  
10 renouvelle tous les trois à quatre jours 70% du milieu de croissance.

Une autre caractéristique dudit procédé est par ailleurs définie par le fait qu'au cours de la période de culture des cellules NT2 en sphères, l'on soumet régulièrement les  
15 neurosphères en suspension dans le milieu de croissance à une centrifugation, et on les repique par dissociation mécanique, effectuée, par exemple, à l'aide d'une pipette Pasteur effilée.

Il a pu être constaté que de manière tout à fait avantageuse, les présentes conditions permettaient d'ensemencer  
20 les sphères NT2 plus de 6 fois sur une période de 60 jours, sans perte de matériel.

Pour induire la différenciation des sphères NT2, le présent procédé prévoit d'utiliser de la poly-D-lysine (PDL), de préférence de faible poids moléculaire (par exemple 30kDa à 70  
25 kDa) en tant que substrat apte à faire adhérer et différencier les sphères de cellules NT2.

D'autre part, selon un mode de mise en œuvre envisageable pour entreprendre la différenciation des sphères de cellules NT2, l'on ensemence ces dernières sur le substrat adhésif sans  
30 les dissocier au préalable.

Dans ce cas de figure, le procédé prévoit d'ensemencer les sphères de cellules NT2 non dissociées à 50 000 - 100 000 cellules/cm<sup>2</sup> en estimant leur nombre par comptage d'une aliquote.

35 Selon un autre mode de mise en œuvre, pour entreprendre la différenciation des sphères de cellules NT2, l'on dissocie au

préalable les sphères de cellules NT2 à l'état de cellules uniques avant de les ensemer sur le substrat adhésif.

De préférence, le procédé prévoit alors d'opérer la dissociation des sphères de cellules NT2 en les incubant pendant  
5 quelques minutes dans une solution de trypsine/EDTA puis en les exposant à une solution contenant 2mM de  $\text{CaCl}_2$ , 0,01% de DNase 1 et 0,5% d'inhibiteur de trypsine.

Une caractéristique supplémentaire consiste encore à ensemer les sphères de cellules NT2 une fois dissociées à 250  
10 000 cellules/cm<sup>2</sup> sur le substrat adhésif, en estimant leur nombre par comptage d'une aliquote.

Par ailleurs, le présent procédé se caractérise également en ce que lors de la phase de différenciation des sphères NT2, l'on cultive ces dernières pendant au moins dix jours.

15 Selon une autre caractéristique avantageuse, le présent procédé prévoit également, préalablement à la phase de différenciation, de congeler les sphères de cellules NT2 entières (sans aucune dissociation préalable) dans un milieu de congélation, défini par le milieu de croissance NS dans lequel  
20 elles ont poussé (milieu conditionné) enrichi par la présence de 10% de Diméthyl Sulfoxyde (DMSO), puis de les décongeler dans un milieu de décongélation défini par un mélange comprenant de préférence 50% en volume du milieu conditionné et 50% en volume du milieu de croissance NS neuf, en présence des facteurs de  
25 croissance bFGF et/ou EGF ou LIF.

D'autres buts et avantages de la présente invention apparaîtront au cours de la description qui va suivre se rapportant à un exemple de réalisation donné à titre d'exemple indicatif et non limitatif.

30 La compréhension de cette description sera facilitée au vu des dessins joints en annexe dans lesquels :

- les figures 1 et 2 correspondent à des photographies en contraste de phase illustrant l'évolution des cellules NT2 au fil du déroulement du présent procédé,

- la figure 3 représente des résultats d'études relatives à la réponse des cellules NT2 aux facteurs de croissance FGF bFGF, et LIF,
- la figure 4 représente une photographie en contraste de phase de sphères NT2 différenciées,
- les figures 5 et 6 représentent des résultats d'analyses d'immunofluorescence effectuées sur les sphères NT2 différenciées,
- la figure 7 représente un western-blot montrant, sur les sphères NT2 différenciées, l'expression d'un marqueur spécifique des neurones, la p3 tubuline.

L'invention concerne le domaine de la neurologie et propose un nouveau procédé d'obtention de neurones, dans lequel des cellules de la lignée de tératocarcinome embryonnaire humain NT2 sont cultivées en agrégats sphériques puis amenées à se différencier en neurones après adhésion sur un substrat.

Dans une étape préliminaire du présent procédé, les cellules de la lignée cellulaire NT2 sont d'abord cultivées de manière classique, en monocouches, dans des flacons à bouchons filtrants contenant un milieu de croissance Opti-MEM (marque déposée par la société Life Technologies) complété par 5% de sérum de veau fœtal, et 5µg/ml de Gentamicine (marque déposée par la société Gibco BRL) à 37°C.

Afin d'entretenir la lignée, les cellules cultivées en monocouches sont dissociées deux fois par semaine à l'état de cellules uniques avec une solution de trypsine/EDTA à 0,25% et repiquées au tiers.

Pour la mise en œuvre du présent procédé, les cellules NT2 cultivées en monocouches sont récupérées et dissociées avec la solution de trypsine/EDTA à 0,25%.

Cette étape permet d'obtenir le premier passage en sphères des cellules NT2 qui sont ensuiteensemencées, de préférence à 100 000 cellules/ml dans des flacons de type FALCON (marque déposée par la société Falcon) de 75 ml à bouchons filtrants contenant 15 ml de milieu de croissance (NS) dépourvu de sérum bovin, défini par la composition suivante : DMEM/F12 (50%/50%),



2mM de glutamine, du complément N2, 0,6% de glucose, 20µg/ml d'insuline, et auquel sont rajoutés extemporanément les facteurs de croissance EGF à 20ng/ml, bFGF à 10ng/ml, 2µg/ml d'héparine ou le facteur de croissance LIF à 10 ng/ml ou 20 ng/ml.

5 Dans ces cultures, visibles sur la figure 1, les cellules dissociées en cellules uniques adhèrent faiblement au support plastique des flacons de culture.

Au bout de 2 jours, les cellules forment de petits agrégats sphériques qui se détachent du plastique et flottent en  
10 suspension dans le milieu de croissance NS, tels que visibles sur la figure 2.

Ces sphères continuent à augmenter en taille et en nombre pendant 7 à 10 jours, et, pour l'entretien de la lignée, celles d'entre elles présentes en suspension dans le milieu de  
15 croissance NS sont centrifugées une fois par semaine et repiquées par dissociation mécanique effectuée au moyen d'une pipette pasteur effilée, à raison de 10 à 12 aller-retours.

Dans ces conditions, les cellules ont été ré-ensemencées plus de 6 fois sur une période de 60 jours, en rajoutant des  
20 facteurs de croissance, ou en renouvelant le milieu de croissance NS, préférentiellement à hauteur de 70%, tous les trois à quatre jours.

La manière dont les cellules NT2 répondent aux facteurs de croissance EGF et bFGF a été étudiée en comptant les cellules  
25 sphériques viables obtenues après trois jours de culture en présence soit de l'un ou l'autre, soit de l'un et l'autre d'entre eux, puis dissociées.

Les résultats représentés sur la figure 3, montrent le nombre de cellules viables après trois jours, tandis que la  
30 ligne horizontale indique la densité d'ensemencement.

Bien qu'il ait pu être observé, de manière inattendue, que les cellules NT2 étaient capables de former des sphères en l'absence de facteurs de croissance, elles prolifèrent néanmoins de façon différente sous l'effet de ces derniers, et en fonction  
35 du type de facteurs de croissance ajouté au milieu de croissance NS.

Ainsi, l'on constate qu'en présence uniquement du facteur de croissance EGF, le taux de prolifération des cellules NT2 est multiplié par 1,5 par rapport aux contrôles correspondant à des cultures sans facteur de croissance.

- 5 Ce taux est multiplié par 2,2 en présence du facteur de croissance bFGF seul, tandis que la présence conjointe des deux facteurs ne montre pas d'effet additionnel.

Selon le présent procédé, pour réaliser la différenciation des sphères NT2, les milieux des flacons de culture contenant  
10 les sphères NT2 sont centrifugés après 7 à 10 jours de prolifération, puis les culots sont lavés deux fois par du Tampon phosphate (phosphate-buffered saline, PBS) afin d'éliminer toute trace de facteurs de croissance EGF et bFGF ou LIF.

- 15 Les cellules non dissociées sont ensuite réparties à 50 000 - 100 000 cellules/cm<sup>2</sup> soit sur des plaques de 24 puits contenant des lamelles en verre recouvertes avec de la poly-D-lysine (PDL) à 40µg/ml, soit sur des boîtes de culture de 15mm de diamètre recouvertes de PDL à 40µg/ml.

- 20 Elle sont cultivées dans ces conditions pendant 10 jours sans changement de milieu.

Selon une autre alternative destinée à permettre une évaluation précise du pourcentage de cellules différenciées, les sphères NT2 sont soumises à une dissociation à l'état de  
25 cellules uniques, par une solution de trypsine/EDTA (0,25%) en présence de 2mM de CaCl<sub>2</sub>, 0,01% de DNase 1 et 0,5% d'inhibiteur de trypsine, avant d'êtreensemencées sur des plaques de 24 puits contenant des lamelles en verre recouvertes par de la PDL.

- En traitant les sphères NT2 de cette manière, l'on observe  
30 qu'elles se différencient spontanément après le retrait des facteurs de croissance, et adhésion sur la PDL.

Cette dernière s'effectue en moins de 24 heures et s'accompagne de l'apparition de deux types cellulaires qui quittent les sphères.

- 35 Au bout de 10 jours de différenciation, les différentes morphologies visibles sur la figure 4 apparaissent, d'une part

des cellules plates et très étendues, et d'autre part des cellules neuronales plus petites, bipolaires et plus ramassées.

Des études ont également été menées pour vérifier les caractéristiques de pluripotence des sphères NT2, et la présence  
5 de cellules neuronales après différenciation.

Ainsi, l'expression des marqueurs spécifiques des neurones (83 tubuline, Map2ab), des oligodendrocytes (O4) et des astrocytes (GFAP) a été étudiée par immunofluorescence, effectuée sur les sphères NT2 différenciées.

10 Les résultats obtenus suite à cette analyse menée de manière classique, montrent qu'à 10 jours de différenciation, 30 à 50% des cellules sont 83 tubuline (figure 5), ou Map2ab positives (figure 6), et qu'à ce stade, aucune cellule n'exprime O4 et GFAP.

15 L'expression de certains neurotransmetteurs a également été étudiée par immunofluorescence, et a montré que le GABA est le neurotransmetteur majoritaire, suivi de la dopamine et de la sérotonine.

Tous ces résultats montrent par conséquent que le procédé  
20 selon l'invention conduit à la production exclusive de neurones, contrairement à la technique basée sur l'utilisation de cellules souches neurales, et qu'en plus cette production donne lieu à une grande quantité de neurones, contrairement à la méthode qui consiste à traiter les cellules NT2 à l'acide rétinoïque.

25 Par ailleurs, les sphères NT2 présentant l'avantage de pouvoir être dissociées pendant plus de deux mois, il a également été vérifié qu'au cours des passages successifs, elles conservaient la même capacité à se différencier en neurones.

Pour cela, les protéines totales des sphères NT2  
30 différenciées ont été extraites à chaque passage, et l'expression de la 83 tubuline a été étudiée à ces stades par western-blot.

Les résultats, visibles sur la figure 7, montrent que l'expression de ce marqueur neuronal est toujours très forte, du  
35 premier au cinquième passage, ce qui correspond à une période qui s'étend sur plus de deux mois, et par conséquent que les

sphères NT2 ne présentent aucune perte de leur potentialité de différenciation neuronale au fil des dissociations.

De surcroît, les sphères de cellules NT2 peuvent être congelées entières (sans aucune dissociation préalable) dans le milieu de croissance NS dans lequel elles ont poussé (milieu de congélation conditionné) en présence de 10% de Dimethyl Sulfoxyde (DMSO).

Ceci permet avantageusement de réaliser un stock de sphères NT2 de faible passage.

Enfin, les sphères de cellules NT2 congelées entières sont décongelées dans du milieu conditionné et du milieu de croissance NS neuf (50%/50%) en présence des facteurs de croissance bFGF et/ou EGF ou LIF.

Dans ce cas, les sphères se désagrègent un peu pendant 3 à 4 jours puis se mettent à proliférer normalement, et peuvent à nouveau être dissociées à l'état de cellules uniques entre 7 et 10 jours après le jour de la décongélation.

Ainsi qu'il ressort clairement de ce qui précède, le procédé selon l'invention présente de nombreux avantages par rapport aux méthodes utilisées classiquement pour produire des neurones.

Les cellules NT2 cultivées en sphères permettent de produire un taux important de neurones, et constituent un modèle particulièrement avantageux pour étudier le développement précoce du système nerveux central humain et la neurogenèse, directement à partir de tissu humain, contrairement aux pratiques habituelles fondées principalement sur l'utilisation de neurones de rat ou de souris, du fait notamment du manque de disponibilité de neurones primaires humains.

Ainsi, les neurones obtenus peuvent être avantageusement utilisés pour sélectionner de nouveaux agents, notamment des molécules et/ou des facteurs protéiques supposés intervenir dans la différenciation des cellules souches neurales, et agissant de sorte à privilégier la prolifération des neurones, au détriment des autres types de cellules neuronales. Le fait de disposer de

tels agents est essentiel, notamment dans une optique de transplantation.

Ces mêmes neurones peuvent également être utilisés pour sélectionner des agents, agissant au niveau de la croissance des neurites, et qui pourraient présenter un intérêt dans le cadre de stratégies réparatrices, pour favoriser la repousse de neurones lésés.

Une autre application intéressante des neurones obtenus par le biais du présent procédé, concerne leur utilisation pour cribler des agents susceptibles de présenter des propriétés neuroprotectrices, c'est à dire aptes à protéger les neurones d'agressions d'origines diverses, telles que, par exemple, celles issues de certains radicaux libres, ou celles faisant suite à un phénomène d'excitotoxicité, de type glutamatergique ou autre. Par ailleurs les neurones obtenus peuvent être utilisés pour évaluer la neurotoxicité intrinsèque de molécules à visée thérapeutique susceptibles d'être en contact avec le système nerveux central. Ils permettent par conséquent la sélection d'agents potentiellement thérapeutiques ne présentant pas de toxicité intrinsèque pour les neurones du système nerveux central.

D'autre part, du fait de l'absence de sérum bovin au cours du procédé, les cellules NT2 constituent également une solution extrêmement prometteuse pour produire des neurones pouvant être utilisés pour l'obtention de greffons permettant d'envisager en toute sécurité une transplantation dans de nombreuses pathologies, notamment les maladies neurodégénératives, les accidents vasculaires cérébraux, les traumatismes de la moelle épinière et du cerveau, les pathologies de la rétine ou de l'oreille interne.

Enfin, un autre avantage important est défini par le fait que les cellules NT2 cultivées de la sorte ne donnent pas naissance aux astrocytes, ce qui élimine les éventuels problèmes évoqués de limitation de la croissance des neurones et de sécrétion de molécules modifiant de façon péjorative l'environnement des cellules greffées.

Bien que l'invention ait été décrite à propos d'une forme de réalisation particulière, il est bien entendu qu'elle n'y est nullement limitée et qu'on peut y apporter diverses modifications de formes, de matériaux et de combinaisons de ces  
5 divers éléments sans pour cela s'éloigner du cadre et de l'esprit de l'invention.

REVENDICATIONS

1) Procédé de production de neurones à partir de cellules d'une lignée cellulaire apte à se différencier pour produire notamment des neurones, dans lequel :

- 5       - on cultive lesdites cellules en sphères, de préférence en les exposant à des facteurs de croissance, tels que, par exemple, EGF (epidermal growth factor) et/ou bFGF (basic fibroblast growth factor) ou du LIF (Leukemia Inhibitory Factor), dans un milieu de croissance défini,
- 10       - on induit la différenciation desdites sphères en les faisant adhérer sur un substrat, après élimination des facteurs de croissance EGF et/ou bFGF ou LIF, et en les cultivant dans le milieu de croissance pendant un laps de temps approprié,

15       caractérisé en ce que l'on utilise les cellules de la lignée de tératocarcinome embryonnaire humain NT2.

2) Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que pour cultiver les cellules de la lignée de tératocarcinome embryonnaire humain (NT2) en sphères,

- 20       - on dissocie des cellules de la lignée de tératocarcinome embryonnaire humain (NT2) cultivées en monocouches avec une solution de trypsine/EDTA (0,25%),
- onensemence les cellules NT2, une fois dissociées, de préférence à 100 000 cellules/ml dans des flacons de culture contenant le milieu de croissance, auquel est
- 25       rajouté extemporanément les facteurs de croissance EGF et/ou le facteur de croissance bFGF ou le LIF,
- on les laisse proliférer pendant une période d'au moins sept jours.

30       3) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce que l'on utilise un milieu de croissance défini dépourvu de sérum bovin.

4) Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé par le fait qu'au cours de la période

de culture des cellules NT2 en sphères, l'on renouvelle régulièrement une fraction du milieu de croissance.

5 5) Procédé selon la revendication 4, caractérisé en ce que l'on renouvelle tous les trois à quatre jours 70% du milieu de croissance.

6) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé par le fait qu'au cours de la période de culture des cellules NT2 en sphères, l'on soumet régulièrement les sphères NT2 en suspension dans le milieu de croissance à une  
10 centrifugation, et on les repique par dissociation mécanique, effectuée, par exemple, à l'aide d'une pipette Pasteur effilée.

7) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que pour induire la différenciation des sphères NT2, l'on utilise de la poly-D-lysine (PDL), de  
15 préférence de faible poids moléculaire (par exemple 30kDa à 70 kDa), en tant que substrat apte à faire adhérer et différencier les sphères de cellules NT2.

8) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisé en ce que, pour entreprendre la différenciation des sphères de cellules NT2, l'on ensemence ces dernières sur le  
20 substrat adhésif sans les dissocier au préalable.

9) Procédé selon la revendication 8, caractérisé en ce que l'on ensemence les sphères de cellules NT2 non dissociées de préférence à 50 000 - 100 000 cellules/cm<sup>2</sup> en estimant leur  
25 nombre par comptage d'une aliquote.

10) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisé en ce que pour entreprendre la différenciation des sphères de cellules NT2, l'on dissocie au préalable les sphères de cellules NT2 à l'état de cellules uniques avant de  
30 les ensemercer sur le substrat adhésif.

11) Procédé selon la revendication 10, caractérisé en ce que l'on dissocie les sphères de cellules NT2 en les incubant pendant quelques minutes dans une solution de trypsine/EDTA (0,25%) puis en les exposant à une solution contenant 2mM de  
35 CaCl<sub>2</sub>, 0,01% de DNase 1 et 0,5% d'inhibiteur de trypsine.



12) Procédé selon l'une quelconque des revendications 10 ou 11, caractérisé en ce que l'on étale les sphères de cellules NT2 dissociées de préférence à 250 000 cellules/cm<sup>2</sup> sur le substrat adhésif, en estimant leur nombre par comptage d'une aliquote.

13) Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que lors de la phase de différenciation des sphères NT2, l'on cultive ces dernières pendant au moins dix jours.

14) Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que préalablement à la phase de différenciation, l'on congèle les sphères de cellules NT2 entières (sans aucune dissociation préalable) dans un milieu de congélation, défini par le milieu de croissance NS dans lequel elles ont poussé (milieu conditionné), enrichi par la présence de 10% de Dimethyl Sulfoxyde (DMSO), puis on les décongèle dans un milieu de décongélation défini par un mélange comprenant de préférence 50% en volume du milieu conditionné et 50% en volume du milieu de croissance NS neuf, en présence des facteurs de croissance bFGF et/ou EGF ou LIF.

15) Utilisation des neurones issus de la mise en œuvre du procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 14, pour l'obtention de greffons destinés à être implantés dans le cadre du traitement de certaines pathologies, notamment des maladies neurodégénératives, des accidents vasculaires cérébraux, des traumatismes de la moelle épinière et du cerveau, des maladies de la rétine ou de l'oreille interne.

16) Utilisation des neurones issus de la mise en œuvre du procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 14, pour la sélection d'agents, tels que des molécules et/ou des facteurs protéiques, susceptibles d'intervenir dans la différenciation des cellules souches neurales.

17) Utilisation des neurones issus de la mise en œuvre du procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 14, pour la sélection d'agents, tels que des molécules ou des facteurs

protéiques, susceptibles de participer au processus de croissance des neurites.

18) Utilisation des neurones issus de la mise en œuvre du procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 14, pour  
5 la sélection d'agents susceptibles de présenter des propriétés neuroprotectrices.

19) Utilisation des neurones issus de la mise en œuvre du procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 14, pour la sélection d'agents potentiellement thérapeutiques ne  
10 présentant pas de toxicité pour les neurones du système nerveux central.

1/3

Fig. 1

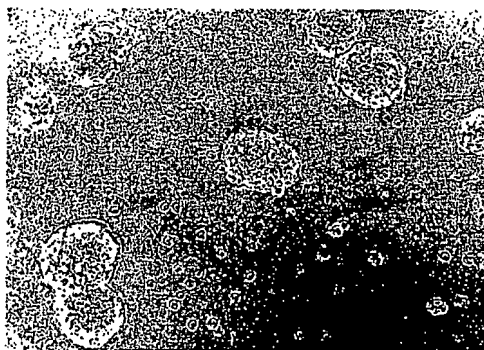
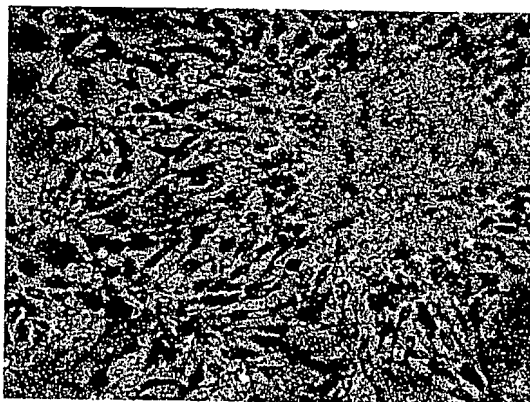
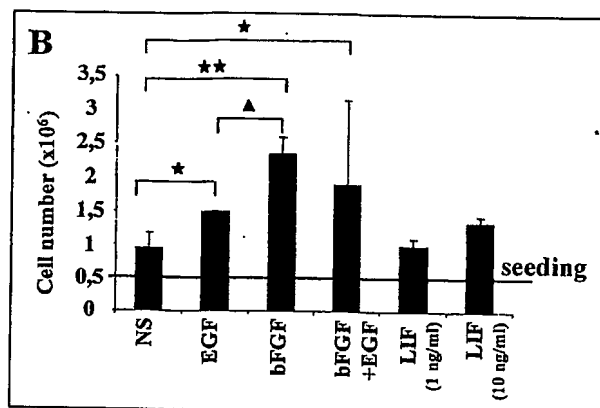


Fig. 2

2/3

Fig. 3Fig. 4

3/3

Fig. 5

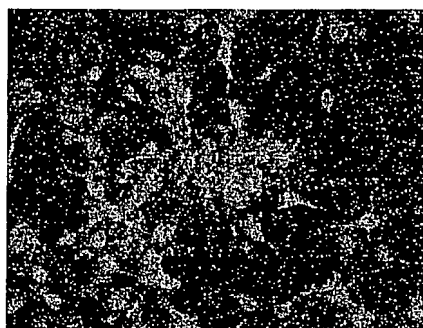


Fig. 6

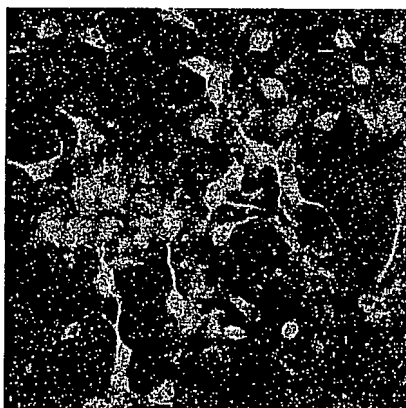
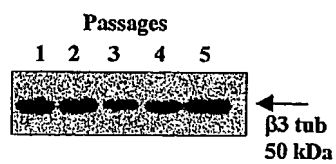


Fig. 7



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR2004/050406

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 7 C12N5/06

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, PAJ, WPI Data, MEDLINE

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	BOUCHER SHERRI ET AL: "Differential connexin expression, gap junction intercellular coupling, and hemichannel formation in NT2/D1 human neural progenitors and terminally differentiated hNT neurons." JOURNAL OF NEUROSCIENCE RESEARCH, vol. 72, no. 3, 1 May 2003 (2003-05-01), pages 393-404, XP002282067 ISSN: 0360-4012 (ISSN print) page 394, left-hand column, last paragraph ----- -/--	1-19

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents:

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \*&\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

31 January 2005

Date of mailing of the international search report

17/02/2005

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel: (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Niebuhr-Ebel, K

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR2004/050406

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ANDREWS P W: "RETINOIC-ACID INDUCES NEURONAL DIFFERENTIATION OF A CLONED HUMAN EMBRYONAL CARCINOMA CELL LINE IN-VIVO" DEVELOPMENTAL BIOLOGY, vol. 103, no. 2, 1984, pages 285-293, XP009031326 ISSN: 0012-1606 the whole document -----	1-19
A	US 5 175 103 A (LEE VIRGINIA ET AL) 29 December 1992 (1992-12-29) "Preparation of pure cultures of post-mitotic human neurons" the whole document -----	1-19

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR2004/050406

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
  
Although claim 15 relates to a method for treatment of the human or animal body, the search was carried out and was based on the effects attributed to the product or composition.
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

### Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

...formation on patent family members

International Application No

PCT/FR2004/050406

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5175103	A	29-12-1992	AT 165617 T 15-05-1998
			CA 2120730 A1 29-04-1993
			DE 69225332 D1 04-06-1998
			DE 69225332 T2 27-08-1998
			DK 620847 T3 07-10-1998
			EP 0620847 A1 26-10-1994
			ES 2117672 T3 16-08-1998
			JP 3169611 B2 28-05-2001
			WO 9308266 A1 29-04-1993
			US 6214334 B1 10-04-2001
			US 5792900 A 11-08-1998
			US 5654189 A 05-08-1997

## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

PCT/FR2004/050406

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE  
CIB 7 C12N5/06

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 C12N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, BIOSIS, PAJ, WPI Data, MEDLINE

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	BOUCHER SHERRI ET AL: "Differential connexin expression, gap junction intercellular coupling, and hemichannel formation in NT2/D1 human neural progenitors and terminally differentiated hNT neurons." JOURNAL OF NEUROSCIENCE RESEARCH, vol. 72, no. 3, 1 mai 2003 (2003-05-01), pages 393-404, XP002282067 ISSN: 0360-4012 (ISSN print) page 394, colonne de gauche, dernier alinéa  ----- -/--	1-19



Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents



Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

## \* Catégories spéciales de documents cités:

- \*A\* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- \*E\* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- \*L\* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- \*O\* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- \*P\* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

\*T\* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

\*X\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

\*Y\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

\*Z\* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

31 janvier 2005

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

17/02/2005

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Niebuhr-Ebel, K

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem. de Internationale No

PCT/FR2004/050406

## C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>ANDREWS P W: "RETINOIC-ACID INDUCES NEURONAL DIFFERENTIATION OF A CLONED HUMAN EMBRYONAL CARCINOMA CELL LINE IN-VIVO" DEVELOPMENTAL BIOLOGY, vol. 103, no. 2, 1984, pages 285-293, XP009031326 ISSN: 0012-1606 le document en entier</p> <p>-----</p>	1-19
A	<p>US 5 175 103 A (LEE VIRGINIA ET AL) 29 décembre 1992 (1992-12-29) "Preparation of pure cultures of post-mitotic human neurons" le document en entier</p> <p>-----</p>	1-19

## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°  
PCT/FR2004/050406

### Cadre II Observations – lorsqu'il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (suite du point 2 de la première feuille)

Conformément à l'article 17.2(a), certaines revendications n'ont pas fait l'objet d'une recherche pour les motifs suivants:

1. ☒ Les revendications n°s —  
se rapportent à un objet à l'égard duquel l'administration n'est pas tenue de procéder à la recherche, à savoir:  
  
Bien que la revendication 15 concerne une méthode de traitement du corps humain/animal, la recherche a été effectuée et basée sur les effets imputés au produit/a la composition.
2. ☐ Les revendications n°s  
se rapportent à des parties de la demande internationale qui ne remplissent pas suffisamment les conditions prescrites pour qu'une recherche significative puisse être effectuée, en particulier:
3. ☐ Les revendications n°s  
sont des revendications dépendantes et ne sont pas rédigées conformément aux dispositions de la deuxième et de la troisième phrases de la règle 6.4.a).

### Cadre III Observations – lorsqu'il y a absence d'unité de l'invention (suite du point 3 de la première feuille)

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs inventions dans la demande internationale, à savoir:

1. ☐ Comme toutes les taxes additionnelles ont été payées dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale porte sur toutes les revendications pouvant faire l'objet d'une recherche.
2. ☐ Comme toutes les recherches portant sur les revendications qui s'y prêtaient ont pu être effectuées sans effort particulier justifiant une taxe additionnelle, l'administration n'a sollicité le paiement d'aucune taxe de cette nature.
3. ☐ Comme une partie seulement des taxes additionnelles demandées a été payée dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur les revendications pour lesquelles les taxes ont été payées, à savoir les revendications n°s
4. ☐ Aucune taxe additionnelle demandée n'a été payée dans les délais par le déposant. En conséquence, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur l'invention mentionnée en premier lieu dans les revendications; elle est couverte par les revendications n°s

Remarque quant à la réserve

- ☐ Les taxes additionnelles étaient accompagnées d'une réserve de la part du déposant.
- ☐ Le paiement des taxes additionnelles n'était assorti d'aucune réserve.

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Dem. de Internationale No

PCT/FR2004/050406

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
US 5175103	A	29-12-1992	AT 165617 T 15-05-1998
			CA 2120730 A1 29-04-1993
			DE 69225332 D1 04-06-1998
			DE 69225332 T2 27-08-1998
			DK 620847 T3 07-10-1998
			EP 0620847 A1 26-10-1994
			ES 2117672 T3 16-08-1998
			JP 3169611 B2 28-05-2001
			WO 9308266 A1 29-04-1993
			US 6214334 B1 10-04-2001
			US 5792900 A 11-08-1998
			US 5654189 A 05-08-1997